

05. 7. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 7 月 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 2 7 1 0 8 4
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 2 7 1 0 8 4]

出 願 人 株式会社クボタ
Applicant(s):

REC'D 26 AUG 2004

WIPO

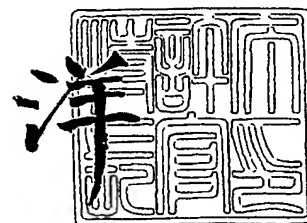
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 8 月 1 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 T103060000
【提出日】 平成15年 7月 4日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
C12M 1/00

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台五丁目 6 番 株式会社クボタ 環境エンジニアリング事業本部バイオセンター内
【氏名】 倉根 隆一郎

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市浜 1 丁目 1 番 1 号 株式会社クボタ内
【氏名】 鳥山 明夫

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台五丁目 6 番 株式会社クボタ 環境エンジニアリング事業本部バイオセンター内
【氏名】 江崎 聡

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台五丁目 6 番 株式会社クボタ 環境エンジニアリング事業本部バイオセンター内
【氏名】 白岩 由紀

【特許出願人】
【識別番号】 000001052
【住所又は居所】 大阪府大阪市浪速区敷津東一丁目 2 番 4 7 号
【氏名又は名称】 株式会社クボタ

【代理人】
【識別番号】 100107308
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区豊崎 5 丁目 8 番 1 号
【弁理士】
【氏名又は名称】 北村 修一郎
【電話番号】 06-6374-1221
【ファクシミリ番号】 06-6375-1620

【選任した代理人】
【識別番号】 100114959
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区豊崎 5 丁目 8 番 1 号
【弁理士】
【氏名又は名称】 山▲崎▼ 徹也
【電話番号】 06-6374-1221
【ファクシミリ番号】 06-6375-1620

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 049700
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

第 1 部材と第 2 部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子マイクロアレイであって、

前記第 1 部材もしくは前記第 2 部材の何れか一方において、他方の部材に対する接触面に複数の溝を並列形成し、反応領域となる空間を複数設けてある生物関連分子マイクロアレイ。

【請求項 2】

第 1 部材と第 2 部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子マイクロアレイであって、

前記第 1 部材および前記第 2 部材の互いの接触面に複数の溝を並列形成し、反応領域となる空間を複数設けてある生物関連分子マイクロアレイ。

【請求項 3】

第 1 部材と第 2 部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子マイクロアレイであって、

前記第 1 部材には、前記第 2 部材に対する接触面に複数の線形凸部を並列形成し、

前記第 2 部材には、前記第 1 部材に対する接触面に前記線形凸部と一対一に嵌合可能な複数の線形溝部を並列形成し、

前記線形凸部と前記線形溝部とを嵌合させつつ、前記第 1 部材と前記第 2 部材とを当接させたとき、前記線形凸部と前記線形溝部との間に反応領域となる空間が形成されるように構成してある生物関連分子マイクロアレイ。

【請求項 4】

前記反応領域と外部を連通可能とし、前記反応領域に試料を供給する試料供給口と反応領域から試料を回収する試料回収口を設けてある請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の生体関連分子マイクロアレイ。

【請求項 5】

前記第 1 部材および前記第 2 部材のうち少なくとも何れか一方を構成する基材が、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂である請求項 1～4 の何れか 1 項に記載の生体関連分子マイクロアレイ。

【請求項 6】

生体関連分子を担持する生体関連分子マイクロアレイであって、

複数の線状反応領域を並設したマイクロアレイ本体を有する生物関連分子マイクロアレイ。

【請求項 7】

前記マイクロアレイ本体を構成する基材が、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂である請求項 6 に記載の生体関連分子マイクロアレイ。

【書類名】明細書

【発明の名称】生体関連分子マイクロアレイ

【技術分野】

【0001】

本発明は生体関連分子マイクロアレイに関し、特に、構成部材の微細加工により形成された反応領域がバーコード状に配置された生体関連分子マイクロアレイに関する。

【背景技術】

【0002】

従来より、環境事業のマーケットでは、土壌浄化と水安全性の領域で問題となる微生物の動態を的確に把握したいという強い要請がある。つまり、上下道水に存在する病原微生物の存在を連続又はリアルタイムにモニタリングすることや、水の安全基準となる大腸菌群、腸内細菌群などを迅速、かつ、正確に定量、同定したいという需要である。また、土壌修復事業の分野でも原位置修復に先立って、対象汚染土壌にどのような微生物が存在しているのか、を正確に調べることにより、的確な修復方法を提案したいという要求もある。さらに、有用微生物を導入するバイオオーギュメンテーションに用いる指標微生物の動態調査、事前事後の土壌診断等、種々の環境事業分野において微生物の的確な動態把握が要求されている。

【0003】

しかしながら、現状では研究室に試料を持ち帰って熟練した検査官によって培養や顕微鏡観察によって検査されており、連続的または現場サイドでリアルタイムにモニタリングを行うことは困難であった。近年、微生物のリボゾームRNA遺伝子の塩基配列解析による同定等、遺伝子レベルでの検出方法が報告されているが、何れも研究室レベルに留まり、現場で使われていることは希であり、微生物属以下の種の同定に関してはほとんど対応することができていないというのが現状であった。これらの現状を鑑みて、微生物属以下の種の同定に関して、種間での遺伝子多型性に焦点をあてた種レベルでの識別方法が試みられている。

【0004】

また、近年のゲノムプロジェクトに代表される遺伝子解析研究の進展に伴い、遺伝子研究は新たな段階を迎えつつあり、今後はゲノム上に存在する遺伝子の機能解析の研究が非常に重要になりつつある。生体における遺伝子は、時間的かつ空間的に調整されており、この調節機構を網羅的に解明する遺伝子発現モニタリング研究が進められている。また、ヒトゲノムのDNAの塩基配列は人により異なっており、特に、1塩基が異なる状態は一塩基多型(SNP)と呼ばれ、かかる相違は個々の薬剤感受性や罹病性の相違に関連するとして、疾病に関連する遺伝子のマッピング、ゲノム新薬、テーラーメイド医療の実現にむけた遺伝子多型の解析研究が進められている。

【0005】

多種類の遺伝子を網羅的に解析することができるマイクロアレイ技術は、包括的な遺伝子発現モニタリング、ゲノムの変異、多型性を検出する上で、ポストゲノム時代の重要な基盤技術として、環境事業分野、医療分野から基礎生物学の分野まで注目されている。特に、ここ数年来、DNAマイクロアレイ技術は、飛躍的な技術的進歩を遂げている。DNAマイクロアレイ(DNAチップ)とは、ミクロな技術を使って、ガラス等の基板上に高密度に整列固定化された遺伝子DNAに対して、蛍光分子等で標識した標的核酸をハイブリダイゼイズさせ、基板上に結合した標識を蛍光スキャナー等で画像化し、解析処理するというものである。

【0006】

DNAマイクロアレイは、その製造方法により、光リソグラフィータイプとスポットティングタイプに大別される。光リソグラフィータイプは光リソグラフィーとコンビナトリアルケミストリーを融合させることにより、オリゴヌクレオチドを基板上に合成する方法である。具体的には、基板上に結合した塩基を光によって脱離する官能基で保護し、反応部位のみを照射できるような光リソグラフィック・マスクを用いることにより特定領域の塩

基だけに光を照射して官能基を脱離させた後、水酸基が保護された塩基と反応させ、基板上の保護基が脱離している塩基とカップリングさせるという工程を繰り返すことにより、数十万種類のオリゴヌクレオチドをガラス基板上に合成するものである（例えば、非特許文献1、特許文献1参照）。一方、スポッティングタイプは、ロボットアームによってDNAを基板上に並べて付着（スポット）させて高密度DNAマイクロアレイを作製する方法であり、高精細度的高速ロボットスポッターを用いることにより、予め調製したDNAプローブを、固相化剤によりコーティングした基板上に高密度にスポットするものである（例えば、非特許文献2、特許文献2参照。）。既に調製してあるプローブを使うことにより、研究者の望みのDNAマイクロアレイをつくることができる。

【0007】

しかしながら、DNAマイクロアレイ技術は開発途上の段階にあり、解決すべき技術上の問題点があった。光リソグラフィタイプは、設計、作成に時間がかかり高価であるため、使用が一部の研究機関に限られるのが現状であった。一方、スポッティングタイプは、基板上にDNAプローブを含む液滴を微量滴下することにより、基板上にDNAプローブを固定化するため、滴下された液滴が基板表面で拡散し、隣接するスポットを干渉してコンタミネーションを起すという問題点があり、更に、各スポットの密度と均一性を担保できないため、精度、再現性の面でも満足できるものではなかった。また、スポット部の周囲に付着した固相化剤の存在によりターゲットDNAが非特異的に基板上に吸着し、ノイズを上昇させてS/N比を低下させるという問題点もあった。

【0008】

そして、マイクロアレイに光を照射した際に発生する蛍光には、蛍光標識から発生する蛍光の他に、基板自体から発生する蛍光が含まれるため、これがバックグラウンドとなり、S/N比を低下させるという問題点があった。また、検出に際しては、通常、市販のマイクロアレイスキャナーを用いて各スポットの蛍光を検出しデータを得ているが、レーザー発振機や光学系システムは非常に高価であり、また、高精度の検出のためには、スポットの位置をマイクロスキャナーに正確に位置決めをする必要があった。したがって、従来法は、精度面、また、コスト面、操作の簡便性の観点から、十分満足できるものであるとは言いがたかった。

【非特許文献1】Foder SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL「生物学的チップによるマルチプレクス型生化学的アッセイ (Multiplexed biochemical assays with biological chips)」1993年 ネイチャー (Nature) 第364巻 p555-556

【特許文献1】米国特許第5,744,305号明細書

【非特許文献2】Shena, M., Shalon, D., Davis, R. W., および Brown, P. O., 「相補DNAマイクロアレイによる遺伝子発現パターンの定量的モニタリング (Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray)」、1995年、サイエンス (Science)、第270巻、p. 467-470

【特許文献2】米国特許第5,807,522号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

そこで、本発明は、上記したようなマイクロアレイ技術に係る実状に鑑みてなされたものであり、低コストに製造および検出することができ、操作が簡便かつS/N比が高く精度よい検出を実現できるマイクロアレイを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記目的を達成するため、鋭意検討した結果、微細加工技術を用いて、試

料を担持させる反応領域を線形状の空間として複数並列的に配置することにより、試料間の干渉を防止した高精度な検出を実現できると共に、安価なラインセンサーにより簡便かつ高精度にデータの読み取りが可能であることを見出した。更に、微細加工される部材として、ポリジメチルシロキサンに着目することにより、更なる低コスト化、および簡便かつ高精度の検出を実現できることを見出した。これらの知見を基礎として本発明を完成するに至った。

【0011】

本発明は、複数の並列する、線形状の反応領域となる空間を設けた生体関連分子マイクロアレイに関し、該空間に生体関連分子を担持することにより、生体関連分子によって選択的に捕獲される標的物質を検出するものである。以下、反応領域となる空間の配置形状からバーコードアレイと略することがある。

【0012】

すなわち、本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子マイクロアレイであって、

前記第1部材もしくは前記第2部材のいずれか一方において、他方の部材に対する接触面に複数の溝を並列形成し、反応領域となる空間を複数設けてあることを特徴とする。

【0013】

更に、本発明の第2の発明は、第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子マイクロアレイであって、

前記第1部材および前記第2部材の互いの接触面に複数の溝を並列形成し、反応領域となる空間を複数設けてあることを特徴とする。

【0014】

本発明の第3の発明は、第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子マイクロアレイであって、

前記第1部材には、前記第2部材に対する接触面に複数の線形凸部を並列形成し、

前記第2部材には、前記第1部材に対する接触面に前記線形凸部と一対一に嵌合可能な複数の線形溝部を並列形成し、

前記線形凸部と前記線形溝部とを嵌合させつつ、前記第1部材と前記第2部材とを当接させたとき、前記線形凸部と前記線形溝部との間に反応領域となる空間が形成されるように構成してあることを特徴とする。

【0015】

本発明の第4の発明は、本発明の第1～3の発明の生体関連分子マイクロアレイであって、前記反応領域と外部を連通可能とし、前記反応領域に試料を供給する試料供給口と反応領域から試料を回収する試料回収口を設けたこと特徴とする。

【0016】

本発明の第5の発明は、本発明の第1～4の発明の生体関連分子マイクロアレイであって、前記第1部材および前記第2部材のうち少なくとも何れか一方を構成する基材が、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂であることを特徴とする。

【0017】

本発明の第6の発明は、生体関連分子を担持する生体関連分子マイクロアレイであって、複数の線状反応領域を並設したマイクロアレイ本体を有することを特徴とする。

【0018】

本発明の第7の発明は、前記マイクロアレイ本体を構成する基材が、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂であることを特徴とする。

【0019】

ここで、本明細書中の「生体関連分子マイクロアレイ」という用語は、生体関連分子が担持される、もしくは、実際に担持されたマイクロアレイを意味し、実際に担持されていないものも含む概念である。「生体関連分子」という用語は、被検対象物を認識し得る

ローブ分子、つまり、互いに親和性を有する物質の一方を選択的に検出し得る分子認識能を有するものを意味する。したがって、基板上に固定されて互いに親和性を有する物質の一方を選択的に検出し得る分子認識能を有する限り、何れの物質をも含む概念であり、cDNA、PCR産物等のDNA断片、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸等の核酸、タンパク質、ペプチド、糖、細胞、微生物等、が好ましく例示されるが、これらに限定されるものではない。生体関連物質は、市販品を利用することができ、細胞、組織等から適当な抽出、精製手段を用いて得られたものを、また、人工的に合成されたものを利用することもできる。生体関連物質として核酸を用いる場合には、公知の方法を用いて細胞もしくは組織より抽出されたDNA、RNAを利用することができ、更には、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、又は化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。また、タンパク質、ペプチドの場合は、細胞若しくは組織等から抽出、精製されたタンパク質、タンパク質をプロテアーゼ等により酵素的若しくは化学的に切断したペプチド断片、組み換え遺伝子技術を用いて合成されたタンパク質、抗体、酵素等を用いることができる。ここで、物質識別能とは、互いに親和性を有する物質を選択的に識別しえることを意味し、例えば、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNAの塩基間でのハイブリダイゼーション（相補的結合）能、抗体、抗体フラグメント-抗原間、または、調節因子、受容体-ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質、レクチン等間、または、酵素-基質、補酵素等間の生体応答能が、好ましく例示される。したがって、本発明のマイクロアレイは、DNAチップ、プロテインチップ、糖鎖チップ、微生物チップ、細胞チップ等として、構成することが可能であり、核酸の配列情報の決定、遺伝子の発現や変異、多様性などの解析、および目的タンパク質の精製、同定、タンパク質の発現、相互作用、翻訳後修飾等の機能解析に好ましく、利用可能である。

【0020】

また、標的物質は、生体関連物質によって捕獲される物質、つまり、部材に担持された生体関連物質と、先に示したような選択的に識別可能な親和性を有して相互作用する物質である。例えば、cDNA、PCR産物等のDNA断片、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸等の核酸、タンパク質、ペプチド、糖、細胞、微生物等、が好ましく例示されるが、これらに限定されるものではない。

【0021】

マイクロアレイに供せられる被検試料は、環境もしくは生体中に存在する標的物質の存在が疑われる試料の何れをも含む概念である。土壌、水等の環境試料、生体試料、食品試料等を例示することができ、これらは、好ましくは、適当な前処理が施され、また、このましくは、適当な標識で標識される。例えば、標的物質が核酸の場合は、上記試料から微生物、動物もしくは、植物の細胞もしくは組織を抽出、精製もしくは単離し、得られた細胞もしくは組織から適当な手段により核酸試料を調製することが好ましい。細胞、組織からの調製は、通常核酸の調製方法に基づいて行われる。mRNAの場合は、標識dNTPの存在下での逆転写反応により、標識cDNAとすることが好ましく、また、原核細胞では、トータルRNAを、また、遺伝子の変異や多型を調べる際には、標識プライマー、若しくは標識dNTPの存在下で標的領域をPCRにより増幅しておくことが好ましい。更に、基板上のDNA断片がオリゴヌクレオチドである場合には、低分子化しておくことが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下、本発明の実施の形態を添付した図面に基づき詳細に説明するしかしながら、本発明は、以下に例示する実施の形態に限定されるものではなく、適当な改変形態も本発明に含まれることは理解できよう。

（第1の実施の形態）

図1は、本発明のバーコードアレイの上面図であり、本発明の基本的構成を示す概略図

である。図2は、図1のA-A線断面図であり、第1の実施の形態として構成された場合における本発明のバーコードアレイを模式的に図示する。以下、図2における上側を「上方」、と、下側を「下方」というものとする。

【0023】

図1および図2に示す通り、本発明のバーコードアレイは、第1部材1と第1部材1の上面に固定配置された第2部材2から構成されており、第1部材1と第2部材2との間には、バーコード形状に配置された反応領域3となる空間が設けられている。

【0024】

第1部材1は平坦な板状体として構成されている。第2部材2は平坦な板状の基材に表面処理が施され、その第1部材1との接触面に、複数の一方向に延伸する溝6がバーコード形状に並列形成されている。つまり、第2部材2は、その第1部材1との接触面側に、複数の線形状の溝6と、該各溝6を区画する隔壁7が交互に並列する空間構造を有している。各溝6は、互いに略平行に配置されることが好ましい。また、図2においては、溝6の断面形状は、溝6の底部が平坦な四角形であるが、これに限定されるものではなく、底部に向かって狭くなる逆三角形や台形等、任意の形状に形成してもよい。

【0025】

そして、第2部材2に形成された各隔壁7の下端面は、第1部材1と緊密に接着されている。このように構成することにより、第2部材2に形成された各溝6の開口は封止され、隔壁7と第1部材1により完全に隔てられた線形状の反応領域3となる空間が形成される。これにより、反応領域3から外部、つまり、隣接する反応領域3に流体が散逸するのを確実に防止することができることから、隣接する反応領域3間での試料のコンタミネーションを確実に防止することが可能となる。

【0026】

第1部材1と第2部材2を構成する基材としては、例えば、ガラス板、石英板、シリコンウェファーなどが好ましく例示されるが、従来用いられる何れの公知の材料をも用いることができる。特に、成形容易性および光学的特性の観点から、光学的観点から、ポリジメチルシロキサン (polydimethylsiloxane、以下、PDMSと略する。)、アクリル樹脂のポリメタクリル酸メチル (poly methyl methacrylate、PMMA、ポリメチルメタクリレート) が好ましく例示される。また、第1部材1と第2部材2を同一の基材を用いて形成することができ、また、異なる基材を用いて形成することもできる。第1部材1、第2部材2の形状、大きさ、厚さ等、いずれも、特に、制限はないが、形状は板状体であることが特に好ましい。また、部材の大きさは、反応領域3の数、大きさ、形状等に応じて適宜決定され、一例として、 $26 \times 76 \text{ mm}$ が挙げられるが、これに限定されるものではない。また、第1部材1、第2部材2の厚さは、部材を構成する基材の種類、部材に要求される形状の安定性、設けられる反応領域3の数、大きさ、形状等に応じて適宜決定されるものとし、第1部材1と第2部材2の適合性をも考慮して決定される。

【0027】

PDMSは、シリコンエラストマーの一種であり、透明性が極めて高く、光学的特性に優れており、広い波長領域での吸収が小さく、特に、可視光領域での吸収が極めて小さく、蛍光検出にもほとんど影響しないため、PDMSをマイクロアレイ基板として用いることにより、S/N値を低くできる。更に、鋳型に対する追従性が高く、ナノからミクロンオーダーでの微細加工が容易であり、任意の微細構造に成形しやすいという特性を有している点で、各種光学機器に最適な形にマイクロアレイを微細加工できるという利点がある。また、PDMSはそれ自体、ガラス、アクリル樹脂などと密着性がよい性質を有しており、微細加工を施されたPDMS部材に平坦なガラス、アクリル樹脂部材を当接させることにより、接着剤等での接着等の接着手段を用いなくとも流路や、チャンバーを形成することが可能となる。

【0028】

反応領域3の形状は線形状の空間であり、バーコード形状に、第1部材1と第2部材2

の間に複数並列形成されている。反応領域3は、生体関連分子の固相化領域として、基板に固相化される生体関連分子、試料、反応溶液の注入、キャピラリー現象によるこれらの拡散のための流路として、生体高分子をガラスPDMS等の基板に結合させる反応に用いるべく構成される。

【0029】

また、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等の実施領域として、さらには、生体関連分子等を固相化した状態で保存する際にはチャンバーとしての役割を有するべく構成されている。

【0030】

この他に、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等の実施は、反応領域3に生体関連分子を固相化した後、アレイを構成する二つの部材の内のいずれか一方（例えば、構成部材がガラスと線形状に加工したPDMSである場合には、PDMS）を剥がし、生体関連分子を固相化した領域全体をカバーできる別の部材（例えば、PDMSチャンバー）で覆い、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等を、このチャンバー内で同時に行うように構成することも可能である。このように構成することにより、アレイ全体を一つの反応槽中で反応させることが可能となることから、煩雑な処理を経なくとも、線形状に形成された各反応領域3を同一の試料で均等に接触させることが可能となる。

【0031】

反応領域3の長さ、幅、奥行き、および反応領域3間の間隔等、いずれも、特に制限はなく、生体関連分子、反応液、試料等を充分かつ均等に展開し、反応に良好な反応液を保持でき、所望の反応を実施できる空間を確保できれば、適宜設計されるものである。反応領域3の幅は、10-200 μm とすることが好ましく例示されるが、これに限定されるものではない。また、反応領域3の幅や間隔をバーコードのように変えて判定情報を読み取れるように構成することも可能である。

【0032】

そして、図1に示す通り、反応領域3と外部を連通可能とする、試料供給口4と試料回収口5を設けた構成とすることができる。試料供給口4は、適切な試料供給手段と接続され反応領域3内に試料を供給する開口であり、試料回収口5は、適切な試料回収手段と接続され反応領域3外に試料を回収、排出する開口である。試料供給口4と試料回収口5は、かかる機能を有し、反応領域3内における所望の反応を妨害するものではない限り、その形状、大きさ、設定位置等、特に制限はなく、適宜設計され得る。したがって、図1においては、第2部材2の反応領域3の長手方向の一端に試料供給口4を設け、また、他端に試料回収口5を設けた構成が開示されているが、これに限定されるものではなく、試料供給口4と試料回収口5とが一つの開口を共有するべく構成することも可能であり、また、第2部材2の反応領域3の真上、または、側方向に、また、第1部材1に形成することも可能である。

【0033】

適切な試料供給手段、試料回収手段としては、ガラス製シリンジ、プラスチックシリンジ、マイクロピペット、フッ化エチレン樹脂チューブ・シリコンチューブ、塩ビチューブ、ペリスタポンプ、プランジャーポンプ、シリンジポンプ等が、もしくは、これらを組み合わせが、好ましく例示される。これらの材質は、核酸、タンパク質等の試料中の物質を非特異的に吸着しないものであることが好ましい。

【0034】

次に、本発明の第1の実施の形態のバーコードアレイの製造方法について説明する。まず、部材表面に微細加工を施す、つまり、第2部材2の第1部材1との接触面に溝6構造を形成する。基板表面に溝を形成する方法は、公知の微細加工技術のいずれの方法をも使用することができる。直接的に形成する方法として、微細加工用ドリル、ブロード等を用いて機械的切削加工法により溝部分を取り除く方法、フォトリソグラフィ、電子ビームリソグラフィ等の電離放射線リソグラフィまたはAFMリソグラフィ、物理的、化学的エッチングにより、溝部分を取り除く方法等、あるいは、これらの方法を組み合わせ

せて用いることが例示される。更に、上記で説明した方法に準じて作製した、所望の溝構造に反転する凸部構造を有する鋳型を用いて該空間構造を転写することにより、間接的に溝を形成することも可能であり、例えば、鋳型を用いた射出成形、もしくは高温でのプレスモールド等を用いることができる。

【0035】

微細構造が施される部材を構成する基材としてPDMSを用いる場合には、PDMSは鋳型に対する追従性が高いので、鋳型を用いて形成する方法が特に好ましく利用できる。鋳型を用いることにより、一旦、鋳型を作製すると、簡便かつ安価に大量のチップを生産できるため、製造コスト削減することができる。

【0036】

次に、微細加工を施された第2部材2の隔壁7（凸部）の上端面と、第1部材1を接着させることにより、溝6の開口を封止する。第1部材1と第2部材2は、好ましくは緊密に接着されるものとし、これにより、反応領域間での試料のコンタミネーションを確実に防止することが可能となる。接着方法は、接着剤を塗布することにより接着可能であるが、PDMSはそれ自身、ガラス、アクリル樹脂などの平面に密着するという性質を有することから、一方の部材にPDMSを用いた場合は、他方の部材として例えば、平らなガラスを用いる場合、ガラス用洗剤（セミコクリーン（フルウチ化学製）等、または0.3N水酸化ナトリウム溶液等）で有機物、ゴミなどを取り除けば接着剤なしで接着することが可能となる。また、プラズマエッチング装置を用いて表面を酸素で処理するとより強固な接着が可能となる。

【0037】

次に、特に、好ましい形態として、鋳型法を用いたPDMSチップの具体的な作成手順について簡単に説明する。鋳型の形成は、公知の微細加工技術を何れをも使用することができ、フォトリソグラフィ技術とエッチング技術を組合わせて利用することが、好ましく例示される。フォトリソグラフィ加工は、シリコンやガラス等の加工する基板上にフォトレジスト（感光性樹脂）を塗布し、熱処理後、所望の流路パターンを形成したフォトマスクを通してレジストを露光し、レジスト層を熱処理した後、所定の現像液で現像することにより行われる。フォトレジストは、露光した部分が現像させるポジ型と、露光されない部分が現像されるネガ型の双方を使用することができ、スピコート、ロールコート、ディップコート等、公知の手段により、基板上に均一に塗布される。現像液は、レジストの種類に応じて適宜選択され、ポジ型レジストには、水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液が、ネガ型レジストは、キシレン／アセトン混合液が好ましく、使用される。

【0038】

次に、好ましくは、上記フォトリソグラフィ処理された基板を、エッチング加工する。エッチングは、硫酸、硝酸、リン酸、フッ酸などの薬液中で行われるウェットエッチング、トリフルオロメタン、テトラフルオロメタン、又は、ヘキサフルオロエタン等を含む、反応性ガスを放電させてプラズマ状態にし、この時発生するラジカル（反応種）とイオンを固体材料と反応させて反応生成物として取り除き、微細パターンを形成するプラズマエッチングに代表される、ドライエッチングの何れをも使用することができるが、溝構造を転写する部材の鋳型からの離型の容易化を図れるとの観点から、エッチングの一方で、CF、CF₂ラジカル等が基板に付着して離型を容易にする保護膜を形成するプラズマエッチングが特に、好ましく例示される。

【0039】

続いて、上記のようにして作製された凹凸形状の空間構造をもつ鋳型を型枠内に固定化し、未架橋のPDMSを適当な重合剤を混合して型に流し込み、硬化させることで、鋳型構造をPDMSに転写する。硬化後、鋳型から剥離することにより、所望の構造の形状パターンを有するPDMS基板が作製できる。硬化温度は、好ましくは、23℃～150℃であり、硬化温度に応じて、硬化時間を設定するものとし、23℃にて24時間、65℃にて4時間、75℃にて2時間30分間、100℃にて1時間、150℃にて15分間が例示され、好ましくは、75℃にて2時間30分間で行うものとする。

【0040】

次に、本発明の第1の実施の形態のバーコードアレイを用いた標的物質の検出方法について例示的に説明する。まず、反応領域3に、標的物質に対して物質識別能を有する生体関連分子を担持する。生体関連分子は反応領域3となる空間を囲む第1部材1、第2部材2表面に固相化される。第1部材1表面、第2部材2表面の何れかの方に固相化すること、また、双方に固相化すること何れも可能である。また、固相化は、第1部材1と第2部材2を接着させた後に行うこともできるが、これらを接着する前に行うことも可能であり、適宜、選択されるものである。部材の接着後に生体関連物質の固相化を行う場合は、生体関連物質を含有する試料を、試料注入口から注入することにより行われる。

【0041】

部材表面に生体関連分子を固相化する方法は、公知の何れの方法を利用することができる。固相化される物質の種類や部材を構成する基材の種類に応じて、適宜最適な方法が選択される。例えば、固相化される生体関連分子が核酸の場合は、静電結合、共有結合が、また、タンパク質の場合は、共有結合法、イオン結合法、物理的吸着法、あるいは、生物学的特異結合等の担体結合法、架橋法、高分子物質で包み込む包括法（格子型あるいはマイクロカプセル型）が好ましく利用される。核酸に関して、具体的方法としては、DNAの荷電を利用してポリリジン、ポリエチレンジイミン等のポリ陽イオンで担体表面に静電結合させる方法、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有する各種シランカップリング剤で表面処理された担体に、末端に官能基としてアミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチン等が導入されたDNAとを共有結合させる方法等を好ましく例示することができる。その後、必要に応じて、紫外線照射、化学架橋剤によるクロスリンク形成、表面のブロッキング、洗浄等の処理を行うものとする。ここで、固相化とは、生体関連分子が本来の活性を損なうことなく、基板表面から実質的に脱離しないことを意味する。

【0042】

次に、標的物質を捕獲するための反応を実施する。試料供給口4から、適当な前処理を行った被検試料溶液、ハイブリダイゼーション溶液等の反応溶液、洗浄液等を、反応領域3内に供給し、所定の反応後、試料回収口5を介して、反応領域3から、回収、排出する。

【0043】

また、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等の実施は、反応領域3に生体関連分子を固相化した後、アレイを構成する二つの部材の内のいずれか一方（例えば、構成部材がガラスと線形状に加工したPDMSである場合には、PDMS）を剥がし、生体関連分子を固相化した領域全体をカバーできる別の部材（例えば、PDMSチャンバー）で覆い、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等を、このチャンバー内で同時に行うように構成することも可能である。このように構成することにより、アレイ全体を一つの反応槽中で反応させることが可能となることから、煩雑な処理を経なくとも、線形状に形成された各反応領域3を同一の試料で均等に接触させることが可能となる。

【0044】

反応後、マイクロアレイ上の生体関連分子と相互作用した被検試料中の標的物質を、例えば、標識物質を指標として検出する。検出手段は、好ましくは、バーコードリーダーのようなラインセンサーが例示される。安価なラインセンサーでデータの読み取りが可能であることから、検出コストの軽減を図ることができる。また、ラインセンサーで読み取る際には、反応領域上を走査する限り、反応領域に直交する方向、もしくは、斜交する方向等、いずれの方向から読み取ることが可能であるため、マイクロスキャナーを利用する場合のような厳密な位置決めが不要であるため操作を簡便化することが可能となる。

【0045】

ここで、本発明の第1の実施の形態においては、第2部材2に溝6を形成した形態を例示的に説明したが、第1部材1に溝6を形成した逆形態も、好ましく本実施の形態として、例示される。

（第2の実施の形態）

次に、図3をもって、本発明の第2の実施の形態のバーコードアレイについて、説明する。図3は、図1のA-A線断面図であり、第2の実施の形態として構成された場合における本発明のバーコードアレイを図示する。第1の実施の形態のバーコードアレイと同一の構成については、図中、同一の符号をもって、説明を省略する。

【0046】

第1部材1および第2部材2は共に、平坦な板状の基材に表面処理が施され、その他方の部材との接触面に、複数の一方向に延伸する溝6がバーコード形状に並列形成されている。つまり、第1部材1と第2部材2とは共に、その第1部材1との接触面側に、複数の線形状の溝6と、該各溝6を区画する隔壁7とが交互に並列する空間構造を有している。そして、第1部材1と第2部材2とを当接させた時に、第1部材1に形成された溝6と、第2部材2に形成された溝6とが、夫々、一対一に対向するように構成されている。

【0047】

そして、第1部材1に形成された各隔壁7の上端面と第2部材2に形成された各隔壁7の下端面とは緊密に接着されている。このように構成することにより、第1部材に第2部材に形成された各溝6の開口が1つの空間を形成し、隔壁7、第1部材および第2部材により完全に隔てられた線形状の反応領域3となる空間が形成される。

(第3の実施の形態)

次に、図4をもって、本発明の第3の実施の形態のバーコードアレイについて説明する。図4は、図1のA-A線断面図であり、第3の実施の形態として構成された場合における本発明のバーコードアレイを模式的に図示する。第1の実施の形態のバーコードアレイと同一の構成については、図中、同一の符号をもって説明を省略する。

【0048】

第1部材1は、平坦な板状の基材に表面処理が施され、第2部材2との接触面に、複数の一方向に延伸する線形凸部8がバーコード形状に並列形成されている。そして、第2部材2も、平坦な板状の基材に表面処理が施され、第1部材1との接触面に前記線形凸部8と一対一に嵌合可能な複数の線形溝部10を並列形成されている。つまり、第1部材1は、その第2部材2との接触面側に、複数の線形凸部8と、該線形凸部8を区画する凹部9とが交互に並列する空間構造を有し、第2部材2は、その第1部材1との接触面側に、複数の線形溝部10と、該各溝部10を区画する隔壁7とが交互に並列する空間構造を有している。そして、前記線形凸部8と前記線形溝部10とを嵌合させつつ、前記第1部材1と前記第2部材2とを当接させたとき、前記線形凸部8と前記線形溝部8との間に反応領域3となる空間が形成されるように構成している。

【0049】

そして、第1部材1に形成された各凹部9と第2部材2に形成された隔壁7とが緊密に嵌合接着されている。このように構成することにより、前記線形凸部8と前記線形溝部10との間に反応領域3となる線形状の空間が形成され、該空間は、隔壁7、第1部材1および第2部材2により外部から完全に隔てられる。このように、基板表面において、反応領域と反応領域以外の領域との間に高低差を設けておき、反応領域表面に検出の焦点をあわせることにより、バックグラウンドからのノイズ検出量を低減させることが可能となり、S/N値を向上させることが可能となる。

【0050】

第1部材1に形成される線形凸部8の高さ、形状等、および、第2部材2に形成される線形溝部10の高さ、形状は、前記線形凸部8と前記線形溝部10とを嵌合させつつ、前記第1部材1と前記第2部材2とを当接させたとき、前記線形凸部8と前記線形溝部10との間に反応領域3となる空間が形成されるよう構成される限り、適宜設定されるものではあるが、線形凸部8の高さは、好ましくは、 $1\mu\text{m}\sim 1\text{cm}$ に形成され、特に好ましくは、 $10\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ である。

【0051】

ここで、本発明の第3の実施の形態として、第1部材1に線形凸部8を、第2部材2に線形溝10を形成する形態を例示的に説明したが、第1部材1に線形溝10を、第2部材

2に線形凸部8を形成する逆形態も好ましい本実施の形態として例示される。

(他の実施の形態)

以下に、本発明の他の実施の形態に関して説明する。

(1) 本発明の生体関連分子マイクロアレイの構成として、一方もしくは双方に微細加工を施した二つの部材を接着させ、その間に形成された反応領域内に生体関連分子を担持させるものについて説明したが、微細加工を施した一の部材のみで構成したものを採用してもよい。つまり、一の部材を造溝加工して、複数の線状の溝を並列形成し、この線状溝を反応領域として生体関連分子を担持させて反応を行うものでもよい。加工される部材としては、成形容易性および光学的特性の観点から、光学的観点から、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂等が例示される。このように構成することにより、閉鎖系領域だけでなく、開放系領域においても、ハイブリダイゼーション等の反応を実施することができると共に、成形容易、かつ、光学的特性にも優れた生体関連分子マイクロアレイを提供することができる。

(2) 次に、一の部材を穴あけ加工して、複数の線状の孔を並列形成し、この線状孔を反応領域として生体関連分子を担持させて反応を行うものでもよく、加工される部材としては、成形容易性および光学的特性の観点から、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂等が例示される。

【実施例1】

【0052】

以下、本発明を実施例により、具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】 PDMSチップの作製

(1) 鋳型の作製

シリコンウェハー(径4インチ、信越化学製)表面を過酸化水素硫酸(過酸化水素:硫酸=1:2)で、続いてバッファードフッ酸で洗浄し、洗浄後、ウェハーを蒸留水ですすぎ、乾燥した。次に、ウェハー上にネガ型エポキシ系硬膜レジストSU-8(Micro Chem社製)をスピncerを用いてスピコートした。スピコートの条件を、以下に示す。

【0053】

スピコート条件(1例、流路高100 μ mの場合)

slope 5秒 \rightarrow 500rpm 5秒 \rightarrow slope 10秒 \rightarrow 2800rpm 30秒 \rightarrow slope 5秒

スピコート後、最低1時間以上、静置した後、ウェハーを65 $^{\circ}$ Cにて10分間、および、それに続く、95 $^{\circ}$ Cにて30分間、熱処理を行った。

【0054】

次に、ウェハーの上に所望の流路パターンに反転する凸部パターンが得られるフォトマスクをのせ、露光装置上で45秒間(流路高100 μ mの場合)、紫外線照射することにより、露光した。ここで、露光時間は、所望の流路高を得るべく、調製されるものである。露光後、ウェハーを65 $^{\circ}$ Cにて3分間および、それに続く、95 $^{\circ}$ Cにて10分間、熱処理を行った。ウェハーをSU-8現像液(メルク社)に入れ、15分間振とうしながらレジスト層を現像することにより、未重合のSU-8を除去した。

【0055】

次に、2-プロパノールで10分間振とうしながらウェハーを洗浄し、続いて、蒸留水で洗浄後、ウェハーを乾燥した。乾燥後、プラズマエッチング装置にてウェハー表面をトリフルオロメタン(CHF₃)で処理した。所望の流路構造に反転した凸部が構築された鋳型を得、以下に示すPDMSの微細加工用の鋳型として用いた。

【0056】

(2) 鋳型からの転写

Sylgard(登録商標)184(Dow Corning社製)とキュア剤(Dow Corning社製)を製造業者の指示に従い、重量比10:1の割合で測り取り、

混合した。24mm×76mm×2mm寸法のものを作るのに約5g必要となり、形成する基板の寸法に応じて、適量測り取る。

【0057】

次に、この混合液をデシケーター内で脱気し、脱気後、ウェハーをセットした型に脱気済PDMSを流し込んだ。そして、75℃のオーブンで2時間半加熱することによって、硬化させた。硬化したPDMSを鋳型から剥離することにより、鋳型の凸部が転写された溝を備えたPDMSチップを作製した。

(発明の効果)

【0058】

本発明のバーコードアレイによれば、線状形空間に区画成形された反応領域に試料を流し込むことから、隣接する反応領域による干渉を防止できる共に、ターゲットDNAの非特異的な基板上への吸着を防止でき、ノイズを低減できることから、高精度な検出が可能となる。

【0059】

更に、基板表面において、反応領域と、反応領域以外の領域との間に、高低差を設けることにより、バックグラウンド蛍光等を低減させることが可能となり、S/N値を向上させることが可能となる。

【0060】

また、高価なマイクロアレイスキャナーを用いずとも、汎用のラインセンサーで、検出が可能となり、コスト削減が可能となると共に、マイクロアレイスキャナーのような正確位置決めがなくとも検出が可能であることから、操作の簡便化を図ることが可能となる。光学的特性に優れたPDMSを基板を構成する基材として使用することにより、低バックグラウンドを達成でき、高いS/N比により検出が可能となる共に、成形容易性にも優れていることから、ナノ、ミクロンオーダーでの加工が容易となり、各種光学的機器に最適な形に製造が可能となり、鋳型を用いた成形方法を採用することにより、大量生産を可能とし、更なるコスト削減効果が期待できる。

また、本機器は前処理のみ、各々の試料に適した方法を用いることにより、何れの試料にも適用可能であるため、環境試料中に含まれる微生物、食品の遺伝子検査、医療分野における遺伝子診断、テーラーメイド医療などへの応用が期待され、バイオ機器の発展に貢献する。

【0061】

また、本発明の生体関連分子マイクロアレイによれば、閉鎖系領域だけでなく、開放系領域での反応が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】本発明のバーコードアレイの上面図であって、本発明の基本的構成を示す概略図

【図2】図1のA-A線断面図であり、第1の実施の形態として構成された場合における本発明のバーコードアレイを図示する模式図

【図3】図1のA-A線断面図であり、第2の実施の形態として構成された場合における本発明のバーコードアレイを図示する模式図

【図4】図1のA-A線断面図であり、第3の実施の形態として構成された場合における本発明のバーコードアレイを図示する模式図

【符号の説明】

【0063】

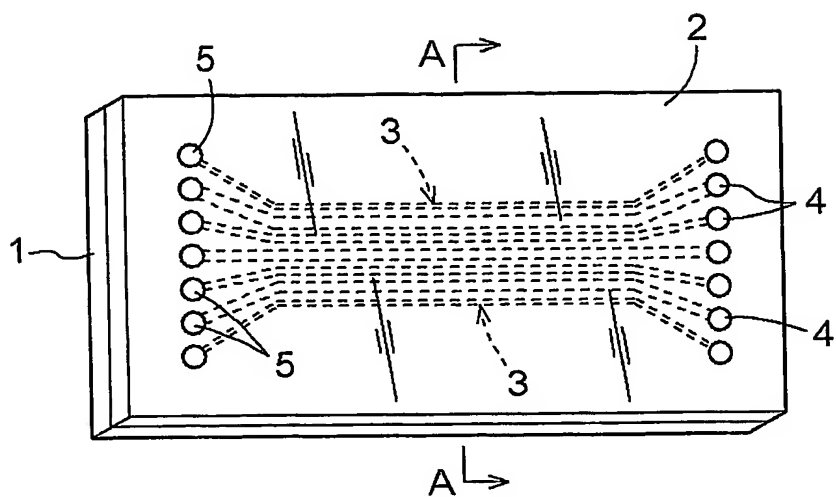
- 1 第1部材
- 2 第2部材
- 3 反応領域
- 4 試料供給口
- 5 試料回収口



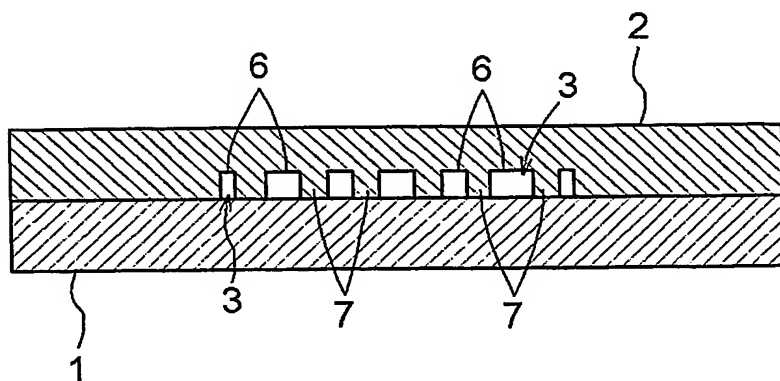
- 6 溝
- 7 隔壁
- 8 線形凸部
- 9 凹部
- 1 0 線形溝部

【書類名】 図面

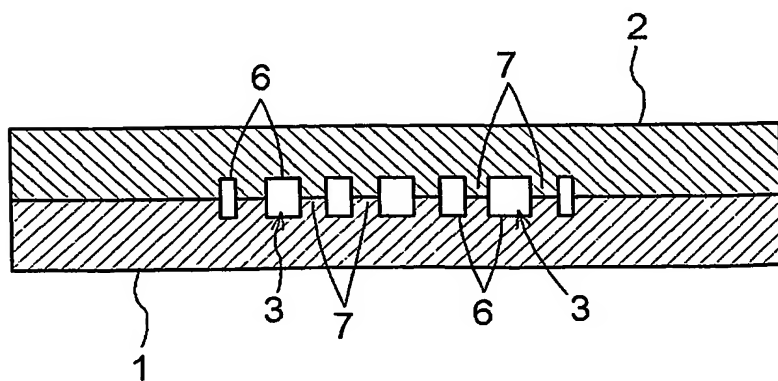
【図 1】



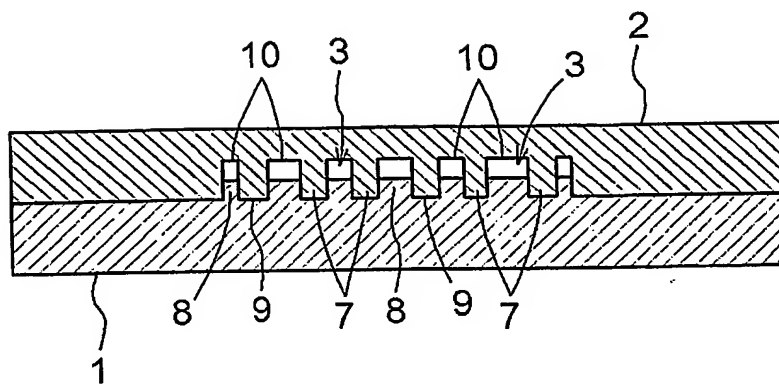
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 本発明は、低コストに製造および検出することができ、操作が簡便かつ S/N 比が高く精度よい検出を実現できるマイクロアレイを提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明者らは、上記目的を達成するため、鋭意検討した結果、微細加工技術を用いて、試料を担持させる反応領域 3 を線形状の空間として複数並列的に配置することにより、試料間の干渉を防止した高精度な検出を実現できると共に、安価なラインセンサーにより簡便かつ高精度にデータの読み取りが可能であることを見出した。更に、微細加工される部材として、ポリジメチルシロキサンに着目することにより、更なる低コスト化、および簡便かつ高精度の検出を実現できることを見出した。これらの知見を基礎として本発明を完成するに至った。

【選択図】 図 1



特願 2 0 0 3 - 2 7 1 0 8 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 1 0 5 2]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 1 0 月 1 1 日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市浪速区敷津東一丁目 2 番 4 7 号
氏 名	株式会社クボタ